

**In-vitro Untersuchungen über die Wirkung
von TCM 199 (Difco) als Verdünnungszusatz zum
menschlichen Inseminationsmedium**

von
Hans-Jürgen Teller
aus
Zwickau

1973

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. O. Hornstein

**In-vitro Untersuchungen über die Wirkung
von TCM 199 (Difco) als Verdünnungszusatz zum
menschlichen Inseminationsmedium**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



vorgelegt
von
Hans-Jürgen Teller
aus
ZwICKAU

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der Universität
Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof.Dr.med. Demling

Referent: Prof.Dr.med. Hornstein

Tag der mündlichen Prüfung: 3.12.1973

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. Einleitung	1
II. Eigene Fragestellung	5
III. Material und Methoden	10
1. Herstellung der Lösung	10
2. Untersuchungsmodus	11
3. Untersuchungsbedingungen	12
4. Modus der Analyse der Untersuchungsergebnisse ..	12
5. Einteilung der Spermata gemäß der klinischen Diagnose	14
IV. Ergebnisse	15
1. Untersuchung zur Ermittlung der optimalen Konzentration der TCM-Stammlösung	15
2. Beeinflussung der Spermienmotilität in der Verdünnungsreihe 1:1 durch die Temperatur	19
3. Vergleich der Verdünnungsreihen Nativ/TCM 2:1 mit Verdünnungsreihen von Bakerscher und Joelscher Lösung im gleichen Mischungsver- hältnis	24
4. Der Einfluß des Glycerins nach Zugabe zur TCM-Stammlösung	27
5. Beobachtung der Langzeitwirkung von TCM bis 72 Stunden nach Wiederverflüssigung	31
6. Differenzierung der TCM-Wirkung nach spermato- logischen Diagnosen	31
V. Diskussion	39
VI. Zusammenfassung	43
VII. Literaturverzeichnis	44

I. E i n l e i t u n g

Seit den frühen Beobachtungen KOELLIKERS hat in der experimentellen Spermatozoenphysiologie die Motilität eine zentrale Stelle eingenommen. Zahlreichen Untersuchungen im Rahmen der grundlagenorientierten Forschung war besonders die Frage nach dem anatomischen Substrat und dem physiologischen Ablauf der Motilität sowie nach den biochemischen Reaktionen gestellt worden.

In den menschlichen Spermatozoen befinden sich die Zellorganellen der Motilität im Mittelstück, das aus einem Hals und einem Verbindungsstück besteht. Das Mittelstück ist zwischen dem Spermienkopf und dem Spermienschwanz lokalisiert. An der unteren Begrenzung des Spermienkopfes befindet sich das vordere Zentriol, aus dem der zentrale Achsenfaden entspringt, der im Bereich des Verbindungsstückes von einer Mitochondrienhülle und einer Plasmamembran umgeben wird.

Die Physiologie des Bewegungsablaufes von Säugetierspermien ist von GRAY, RIKMENSPOEL, BISHOP und NELSON untersucht worden. Das der Fortbewegung dienende Flagellum führt durch Kontraktionen sinusförmige Ausschläge durch, während die Spitze des Flagellums eine Achterbewegung beschreibt. Der Bewegungsablauf ist somit dreidimensional. Die Amplitudenhöhe der jeweiligen Wellen sowie die Wellenfrequenz bestimmen im Zusammenhang mit der Konsistenz des umgebenden Mediums Geschwindigkeit und Richtung des Bewegungsablaufes. Zusätzlich werden in einer bedeutend langsameren Frequenz Rotationen zur Längsachse durch kurzes Seitwärtsschlagen des Kopfes durchgeführt.

Untersuchungen zur Beeinflussung der Spermienbeweglichkeit durch Zusatz von Verdünnungslösungen sind durch GRAY, ROTH-SCHILD, EMMENS und SWYER, WHITE, WALES und WHITE, CHANG, KENNEDY, NELSON, NEVO und andere vorgenommen worden.

Diese Untersuchungen sagen im Ergebnis aus, daß durch eine Verdünnung des Spermas die Spermienbeweglichkeit initial gesteigert wird, die weitere Lebensfähigkeit der Spermien jedoch abnimmt. Exzessive Dilution führt zu einer Schädigung der für die

Motilität zuständigen Organellen, die anfänglich noch reversibel, bei stärkeren Graden jedoch irreversibel ist.

Was diesen Verdünnungseffekten eigentlich zugrundeliegt, ist bisher nicht eindeutig abgeklärt worden. In erster Linie sind Elektrolytlösungen zur Verdünnung verwendet worden. Die Ionenzusammensetzung ist insofern von Bedeutung, als eine qualitative Staffellung der Ionenwirkung festgestellt werden kann. Im Bereich der Anionen sind dies mit abnehmender Wirkung Phosphat, Citrat, Tartrat, weiter abnehmend Nitrat, Chlorat, Bromide und vor allem Chloride. Hinsichtlich der Kationen ist insbesondere die Wirkung von Kalium, Magnesium und Calcium untersucht worden. Eine zu hohe oder zu niedrige Konzentration von Kalium und Magnesium ist schädlich, was bei Natrium und Calcium weniger ausgeprägt ist (MANN, JOEL).

Ein weiterer Schritt in der Entwicklung von optimalen Verdünnungslösungen ist in der Zugabe von Glukose und Fruktose zu den Ionenmedien zu sehen. Fruktose, bzw. Glukose bei Konvertierbarkeit von Glukose zu Fruktose, ist das Substrat des glykolytischen Zellmetabolismus, der bei anaeroben Bedingungen die Energien vor allem für den Bewegungsablauf erbringt.

Unter aeroben Bedingungen kann an Stelle der Glykolyse die Atmung bzw. Veratmung spermieneigener Substanzen treten. Durch die Zugabe der genannten Zuckerarten wird den Spermien das Substrat ihres Energiestoffwechsels angeboten und so das biologische Medium in dieser Hinsicht nachgeahmt. Die Fruktose wird beim Menschen in den Samenbläschen produziert. Einen großen Fortschritt in der Technik der Samenkonservierung stellte die Einführung kolloidaler Lösungen dar (LARDY u. PHILLIPS). Sie verwendeten frisches Eigelb, das sie mit einer gleichen Menge Phosphatpuffer mischten (aus EIBL: Lehrbuch der Rinderbesamung). Dadurch erlangte das bereits erwähnte Problem der Dilution große Bedeutung bei der Entwicklung geeigneter Inseminationsmedien.

Zunächst wurde abgelagertes Seminalplasma als Verdünnungsmedium untersucht. In der experimentellen Spermienphysiologie des Menschen sind weiterhin Blutplasma bzw. -serum (MILBRADT), sowie hämolysiertes Blut (SCHIRREN) herangezogen worden.

In der praktischen Veterinärmedizin und in der Human-Andrologie werden als Inseminationsmedien Eidotter und Milch verwendet. Die Bedeutung des Eigelbs liegt einmal in der Pufferwirkung, wodurch die im glykolytischen Abbau entstehende Milchsäure durch organische Pufferkapazitäten neutralisiert wird. Des weiteren bieten die im Eigelb enthaltenen Lipoproteide und Lecithine einen Schutz gegenüber dem Kälteschock. Bei Tiefkühlkonservierung soll die Verdünnungsflüssigkeit eine Spermienkonservierung gewährleisten. Die Stoffwechselaktivität muß in der Zeit der Tiefgefrierung vollständig sistieren.

Daß die Spermien eine solche Kältekonservierung überhaupt überleben können, wurde zunächst beiläufig durch die Zugabe von Glycerin zur Verdünnungsflüssigkeit entdeckt. Glycerin entzieht den Spermien Wasser. Auf diese Weise wird eine deletäre intrazelluläre Kristallbildung verhindert. Eine Senkung der Stoffwechselaktivität kann so ohne Schaden herbeigeführt werden. In dieser Hinsicht ist weiterhin von Bedeutung, daß der pH-Wert des Verdünnungsmediums relativ sauer ist, wodurch die Spermatozoenaktivität von vornherein verringert wird. Andererseits muß das Verdünnungsmedium Substanzen inkorporiert haben, die nach Beendigung der Tiefkühlkonservierung eine Aktivierung des Zellstoffwechsels herbeiführen, wobei die glykolytische Energiegewinnung eine besonders große Rolle spielt. Gleichzeitig sollen die oben angeführten toxischen Stoffwechselprodukte neutralisiert werden.

In dieser Hinsicht stellt Hühnereidotter ein optimales Verdünnungsmedium dar. Es enthält die folgenden wichtigen Bestandteile:

Phosphorprotein	(Vitellin)
Albumine	
Globuline	
Hämatogen	(Fe - haltig)
Fette	
Lipoide	wie Cholesterin
	Lecithin
	Kephalin
Glukose	
Lutein	
Phosphate	

Aus den erwähnten Gründen wird Citrat zur Säuerung, Glukose und Glycerin dazugegeben. Ein weiterer Zusatz zur Steigerung der Spermienbeweglichkeit ist in Glykokoll zu sehen, das in einer 2%igen Konzentration zur Anwendung kommt. Die ersten Beobachtungen über eine belebende Glykokollwirkung gehen auf BONADONNA zurück, exakte Analysen sind von BAIER, LEIDL und GREIFF durchgeführt worden.

II. Eigene Fragestellung

In Ergänzung zu den oben angegebenen Untersuchungen von BAIER, LEIDL und GREIFF stellten wir uns die Frage, ob lediglich die Aminosäure Glykokoll und nicht noch weitere Aminosäuren, insbesondere die sog. essentiellen Aminosäuren, eine Motilitätssteigerung herbeiführen könnten.

In dem Inseminationsmedium ist zwar durch den Eidotteranteil eine Ionenzugabe gewährleistet, die quantitativen Mengenverhältnisse liegen jedoch unter denen der üblichen Elektrolytverdünner, wie der Baker'schen, der Joel'schen und der Locke'schen Lösung.

Die Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Baker-Lösung	Rp.	Glukose	3,0
		Na ₂ HPO ₄	0,6
		KH ₂ PO ₄	0,01
		NaCl	0,2
		Aq.dest.ad	100,0
Joel-Lösung	Rp.	Dextrose 5,42 %	80,0
		N/8 MgCl	20,0
Locke-Lösung	Rp.	CaCl ₂	0,24
		KCl	0,42
		NaCO ₃	0,1
		NaCl	0,9
		Aq.dest.ad.	100,0

Ein weiterer Gesichtspunkt stellte sich mit der Frage der Zugabe phosphorylierter Purinkörper wie ATP als Energiespender für die Glykolyse.

In dieser Hinsicht bot sich für unsere Untersuchungen das TCM 199 an, welches als Kulturmedium zur Zellzüchtung breite Anwendung findet (Difco Supplementary Literature 1966, Difco Laboratories Detroit, Michigan USA).

Die Zusammensetzung dieses Mediums ist folgende:

MEDIA

TC-MEDIUM 199

Ingredients per liter

L-Arginine	70 mg	Inositol	0,05 mg
L-Histidine	20 mg	p-Aminobenzoic Acid	0,05 mg
L-Lysine	70 mg	Vitamin A	0,1 mg
L-Tyrosine	40 mg	Calciferol	0,1 mg
DL-Tryptophane	20 mg	Menadione	0,01 mg
DL-Phenylalanine	50 mg	a-Tocopherol Phosphate	0,01 mg
L-Cystine	20 mg	Ascorbic Acid	0,05 mg
DL-Methionine	30 mg	Glutathione	0,05 mg
DL-Serine	50 mg	Cholesterol	0,2 mg
DL-Threonine	60 mg	L-Glutamine	100 mg
DL-Leucine	120 mg	Adenosinetriphosphate	1 mg
DL-Isoleucine	40 mg	Adenylic Acid	0,2 mg
DL-Valine	50 mg	Ribose	0,5 mg
DL-Glutamic Acid	150 mg	Desoxyribose	0,5 mg
DL-Aspartic Acid	60 mg	Bacto-Dextrose	1 g
DL-Alanine	50 mg	Tween 80	50 mg
L-Proline	40 mg	Sodium Acetate	50 mg
L-Hydroxyproline	10 mg	Iron (as Ferric Nitrate)	0,1 mg
Glycine	50 mg	Sodium Chloride	8 g
L-Cysteine	0,1 mg	Potassium Chloride	0,4 g
Adenine	10 mg	Calcium Chloride	0,14 g
Guanine	0,3 mg	Magnesium Sulfate	0,2 g
Xanthine	0,3 mg	Disodium Phosphate	0,06 g
Hypoxanthine	0,3 mg	Monopotassium	
Thymine	0,3 mg	Phosphate	0,06 g
Uracil	0,3 mg	Sodium Bicarbonate	0,35 g
Thiamine	0,01 mg	Bacto-Phenol Red	0,02 g
Riboflavin	0,01 mg	Carbon Dioxide to pH 7,2	
Pyridoxine	0,025 mg	Triple Distilled	
Pyridoxal	0,025 mg	Water	1000 ml
Niacin	0,025 mg		
Niacinamide	0,025 mg		
Pantothenate	0,01 mg		
Biotin	0,01 mg		
Folic Acid	0,01 mg		
Choline	0,5 mg		

TCM 199 ist chemisch genau definiert und für die Züchtung von Gewebekulturen sowie für die Virusforschung gut geeignet, ganz besonders für Viruskulturen. Es ist ein basales Nährmedium, dem zusätzlich Wachstumsfaktoren beigegeben werden können für die Züchtung von Zellkulturen für morphologische, histochemische und physiologische Studien.

Die Verwendung von TCM 199 empfiehlt sich besonders für die Diagnose und Erforschung von Virus-Infektionen. Es ersetzt zunehmend ultrafiltriertes Serum sowie ausgewogene Elektrolytlösungen bei der Züchtung von Gewebekulturen. Es ist teilweise überlegen bei der Züchtung von Polio- und anderen Viren. Des weiteren ist aufgezeigt worden, daß TCM 199 praktische Anwendung bei der Diagnose von Virus-Infektionen durch die Gewebekulturtechnik gefunden hat.

(Sinngemäß entnommen und übersetzt aus Difco Supplementary Literature 1966).

Zum Vergleich sei hier die chemische Zusammensetzung nativen Spermaplasmas angeführt:

Tabelle 5
Die chemische Zusammensetzung des Spermaplasmas

Stoffe	Menge	Autoren
Trockensubstanz	10 — 20 %	Weisman ¹
Salze	1 — 2 %	
Organ. Subst.	8 — 10 %	
Proteine	2 — 6 %	
ätherlösl. S.	0,21 %	
Ges. Eiweiß	6,0 — 8,0 g %	Keutel/Galsch ²
Aminosäuren	55 — 70 mg/ccm	Keutel/Galsch ²
Rest-Stickstoff	55 — 88 mg %	Huggins/Johnson ³
Harnstoff	72 mg %	Goldblatt ⁴
Reduz. Subst.	380 — 610 mg %	Shedlovsky ⁵
Organ. Säuren	468 — 603 mg %	Shedlovsky ⁵
Milchsäure	90 — 100 mg %	Goldblatt ⁴
Zitrate	140 — 637 mg %	Huggins/Neal ⁶
Cholesterin	80 mg %	Goldblatt ⁴
Phosphor		
anorgan. P.	40 — 50 mg %	Goldblatt ⁴
total-säurel. P	95 mg %	Goldblatt ⁴
Spermin-P.	15 — 30 mg %	Goldblatt ⁴
NaCl	230 — 280 mg %	Shedlovsky ⁵
Kalzium	24 — 25 mg %	Goldblatt ⁴
Kohlendioxid (als Bikarbonat)	18,3 — 26,9 mval/ Liter	Shedlovsky ⁵

(Entnommen aus VASTERLING: Praktische Spermatologie)

TABELLE VII
DIE AMINOSÄUREN IM MENSCHLICHEN EJAKULAT UND BLUTPLASMA
(DOEPFNER UND KRAMPITZ 1961)

Amphotere Aminosäuren mg/cm ³	Normo- spermie	Oligo- spermie	Azoos- permie	Blutplasma
Glutathion	*	—	—	—
Methionin	0,038	0,021	0,007	0,0008
Cystin	0,034	0,002	0,006	0,010
Cystein	**	—	—	—
Taurin	***	—	—	0,004
Glycin	0,589	0,251	0,230	0,018
Oxyprolin	α	—	—	—
Alanin	0,291	0,141	0,096	0,036
Prolin	0,269	0,100	0,139	0,016
Tyrosin	0,514	0,207	0,232	0,009
Valin	0,498	0,240	0,134	0,037
Phenylalanin	0,282	0,146	0,164	0,009
α - γ -Diaminobuttersäure	β	—	—	—
Threonin	0,477	0,282	0,190	0,012
Tryptophan	γ	—	—	—
Serin	1,116	0,560	0,429	0,010
β -Alanin	0,360	0,109	0,158	—
β -Amino-iso-buttersäure	0,317	0,171	0,053	—
Isoleucin D	0,624	0,259	0,191	0,023
Leucin D	0,967	0,506	0,332	0,013
	6,426	2,995	2,361	0,1978
Saure Aminosäuren mg/cm ³				
Asparaginsäure	0,998	0,458	0,336	0,007
Glutaminsäure	1,797	1,193	1,152	0,094
	2,795	1,651	1,988	0,101
Basische Aminosäuren mg/cm ³				
Arginin	0,790	0,310	0,295	0,014
Lysin	1,521	0,587	0,580	0,027
Ornithin	δ	—	—	0,007
Histidin	1,091	0,443	0,378	0,014
	3,402	1,340	1,773	0,062

* hydrolysiert

** wird als Cystin bestimmt

*** Bestimmung ungenau

α nicht gefunden, β nicht gefunden, γ bei Hydrolyse zerstört, δ nicht gefunden.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war die Beobachtung der TCM-Wirkung, wobei verschiedene TCM Konzentrationen verwendet wurden. Entsprechend den Voraussetzungen des menschlichen Inseminationsmediums konnte TCM nicht als alleinige Substanz zur Anwendung kommen. Vielmehr setzten wir es den wesentlichen Bestandteilen des Inseminationsmediums zu, d.h. wir verwendeten Glukose-Citrat und TCM im Verhältnis 1:1. Die genaue Verfahrensweise der Herstellung des Mediums siehe S.10.

Der Eidottergehalt konnte wegen des breiten Substanzspektrums des TCM auf 10% reduziert werden. Die Versuche wurden teilweise mit und teilweise ohne Zusatz von Glycerin durchgeführt (14 Vol %). Die Versuche sind als in-vitro Versuche durchgeführt worden, vorwiegend als Kurzzeitversuche, in einer gesonderten Reihe auch als Langzeitversuche.

III. Material und Methoden

Das Sperma wurde durch Masturbation bei durchgehend fünf-tägiger Karenz gewonnen. Es wurde in einem sterilen Standgefäß aufgefangen und bis zur Wiederverflüssigung unter Luftabschluß aufbewahrt (bei Raumtemperatur und Vermeidung stärke-kerer Lichteinflüsse).

Die Untersuchungen begannen im allgemeinen spätestens eine halbe Stunde nach Wiederverflüssigung (n.W.). Es handelt sich um Sperma von insgesamt 37 Patienten, die wegen Sub- oder Infertilität die andrologische Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen aufgesucht hatten. Zum Vergleich wurden die Spermaproben von 5 gesunden jungen Männern herangezogen (Studenten), die einen weitgehend normalen spermatologischen Befund gezeigt hatten, deren Fertilität jedoch noch nicht erwiesen war.

Als Grundlösung ist folgendes Medium zur Anwendung gekommen:

1. Herstellen der Lösung

a) Glukose - Citrat	10 ml Glukose (5%)
	+ 15 ml Na-Citrat (2,8 %)
	= 25 ml Glukose-Citrat (2:3), davon
	2,5 ml verwerfen
	= 22,5 ml Glukose-Citrat
+ b) TCM	+ 22,5 ml
	= 45 ml Lösung (1:1), dazu
+ c) Eigelb	+ 5 ml
	= 50 ml Lösung

Zusätze: a) 50 000 Einheiten Penicillin G

b) 25 mg Streptomycin

c) 1,3 %iger Bikarbonatpuffer

d) eingestellter pH-Wert 7,2 (mit Indikatorpapier).

2. Untersuchungsmodus

Vergleichende quantitative und qualitative Motilitätsbestimmungen.

- a) Quantitativ: Auszählen von insgesamt 100 Spermien nach den Kriterien beweglich und nicht beweglich. Angeführt wird der Prozentsatz an beweglichen Spermien, also z.B. 80%, was einer idealen Motilität entspräche.
- b) Qualitativ: Der Anteil der progressiv beweglichen Spermien wurde durch Schätzung ermittelt, die graduelle Einteilung wie folgt vorgenommen:

0 = keine Progressivität

g.v. = ganz vereinzelt progressiv

v. = vereinzelt progressiv

1/3 p. = 1/3 progressiv

1/2 p. = 1/2 progressiv

üb. p. = überwiegend progressiv

- c) Zeitpunkte der Motilitätsbestimmungen:

Letztere wurden unmittelbar nach Wiederverflüssigung und Durchmischung des Spermas durchgeführt, wobei als Äquilibrationszeit ein Mindestzeitraum von 10 Min. galt,

= Zeitpunkt a,

nach 60 bis 90 Min. = Zeitpunkt b,

nach 150 bis 210 Min. = Zeitpunkt c.

In einer gesonderten Reihe wurde auch noch nach 4, 10, 24, 48, und 72 Stunden nach Wiederverflüssigung ausgezählt.

Sämtliche Motilitätsbestimmungen wurden mit einem Leitz Mikroskop bei 400 facher Vergrößerung durchgeführt.

3. Untersuchungsbedingungen

- a) Raumtemperatur - Brutschranktemperatur
- b) Unterschiedliche Konzentration des Mediums, wobei folgende Verhältnisse gewählt wurden:

Nativ/Medium im Verhältnis	2/1
" " "	1/1
" " "	1/2

- c) Vergleich der TCM-Wirkung mit Elektrolytverdünnern (Baker- und Joel-Lösung).
Als Verdünnungsgrad wurde entsprechend den unter 3.b) ermittelten Ergebnissen die Verdünnung 1/1 sowie 2/1 gewählt.
- d) Zur Analyse der Glycerinwirkung wurde Glycerin in einer Konzentration von 14 Vol.% dem vorhergenannten Medium zugefügt und mit der reinen TCM-Verdünnung verglichen.
- e) Zur Bestimmung der TCM-Langzeitwirkung wurde bei einer Verdünnung von 1/1 über 4, 10, 24, 48, und 72 Stunden die Motilität bestimmt.

4. Modus der Analyse der Untersuchungsergebnisse

Die ermittelten Werte wurden graduell als Steigerung bzw. Abfall der Motilität im Vergleich mit der Nativprobe eingestuft. Hinsichtlich der quantitativen Motilität wurde folgende Skala gebildet:

Zunahme bzw. Abfall um $\pm 0\%$	sowie ≤ 0
Zunahme um 0-5 %	
Zunahme um 6-10%	
Zunahme " 11-15%	
Zunahme " $>15\%$	

Bei der qualitativen Bewertung wurden die Steigerung bzw. der Abfall bezüglich der progressiven Spermienmotilität in folgenden Progressionsstufen ausgedrückt:

> 2	Steigerung um mehr als 2 Stufen
1 bis 2	Steigerung um mehr als 1 Stufe , max. 2 Stufen
1/2 " 1	Steigerung um mehr als 1/2 Stufe , max. 1 Stufe
0 " 1/2	Steigerung um max. 1/2 Stufe
0	keinerlei Änderung
-1/2 " 0	Abfall um max. 1/2 Stufe
- 1 " -1/2	Abfall um mehr als 1/2 bis max. 1 Stufe
- 2 " - 1	Abfall um mehr als 1 Stufe

Diese Progressionsstufen beziehen sich auf meine Unterteilung der qualitativen Motilität von S.11.

Ich möchte diese im folgenden nochmals erläutern.

Progressionsstufen

0	>	Es bedeutet z.B. eine Steigerung
g.v.		von 0 auf g.v. eine ganze Stufe
v.	>	Erfolgte eine Steigerung von z.B.
1/3 p.		v. auf v. bis 1/3 p.,so beträgt die
1/2 p.		Steigerungsquote eine halbe Stufe
üb. p.	>	Kam eine Steigerung von 1/3 p. auf üb. p.
		zustande,so entspricht dies zwei Stufen
		Progressivitätszunahme

In diesem Zusammenhang seien einige Abweichungen bezüglich der Spermienbeweglichkeit erwähnt.Im Gegensatz zu progressiv motilen Spermatozoen eines gesunden Spermas, die das Blickfeld linear passieren, kennen wir auch pathologische Bewegungsformen. Man kann in solchen Fällen unter dem Mikroskop Kreisdreher und Umkehrer, sowie pendelnde, zitternde und hyperkinetische Bewegungsabläufe unterscheiden, um die wichtigsten zu nennen.

Zur übersichtlichen Tabellierung und graphischen Darstellung wurden die Steigerungsquoten bzw. Abfallquoten gegenüber der Nativprobe lediglich unmittelbar nach Wiederverflüssigung und 2 1/2 Stunden danach herangezogen (erster und letzter Zeitwert). Die Meßergebnisse der Langzeitbeobachtung sind in einer gesonderten Untersuchungsreihe angeführt.

Zur weiteren Analyse der TCM-Wirkung wurden die Befunde nicht nur global angeführt, sondern differenziert hinsichtlich der spermatologischen und klinisch-andrologischen Gegebenheiten.

5. Einteilung der Spermata gemäß der klinischen Diagnose

- a) Qualitative Asthenozoospermie , d.h. Spermata, die in Dichte und Morphologie Normbefunde aufwiesen, ebenso auch in der initialen quantitativen Motilität. Der Motilitätsabfall im weiteren Zeitablauf ist ebenfalls normgerecht, die Spermienprogression jedoch eingeschränkt.
- b) Qualitative und quantitative Asthenozoospermie , d.h. Spermata, bei denen eine mittelgradige qualitative und quantitative Einschränkung der Motilität vorlag.
- c) Asthenoteratozoospermie , gleichfalls mit Einschränkungen in der Spermiedichte und -morphologie.
- d) Spermata mit Viskosipathie des Seminalplasmas sowie mit sog. Agglomerationsphänomenen. Gewöhnlich ist hiermit eine verspätet eintretende Wiederverflüssigung korreliert. Häufig werden dabei Agglomerationsphänomene beobachtet, die auch als Pseudoagglutination (clumping) bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um unspezifische, d.h. wahrscheinlich nicht immunologisch bedingte, teils großflächige, teils disseminiert kleinflächige Phänomene von Spermatozoenzusammenballungen, häufig um Zellelemente (Leukozyten, Epithelien), bzw. um visköse Partien des Seminalplasmas.
- e) Hinsichtlich der klinisch-andrologischen Bedingungen wurden Entzündungsprozesse der Prostata, der Samenblasen, und des Nebenhodens ausgewählt, die im Sinne einer bakteriellen bzw. abakteriellen chronisch rezidivierenden Entzündung aufgefaßt wurden.

IV. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Konzentration der TCM - Stammlösung

Verwendet wurde die im Kapitel Material und Methoden angeführte Stammlösung in den

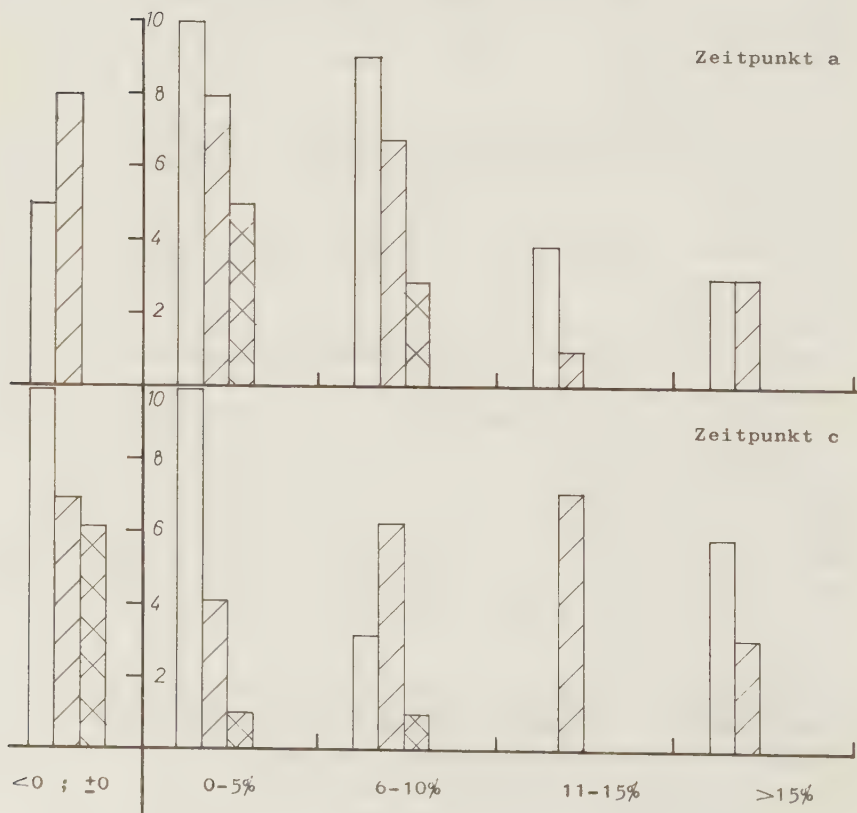
Verdünnungsverhältnissen	1/1
	2/1
	1/2

Insgesamt sind 37 Spermata in dieser Hinsicht untersucht worden (einschließlich der Langzeituntersuchungen).

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Quantitativ

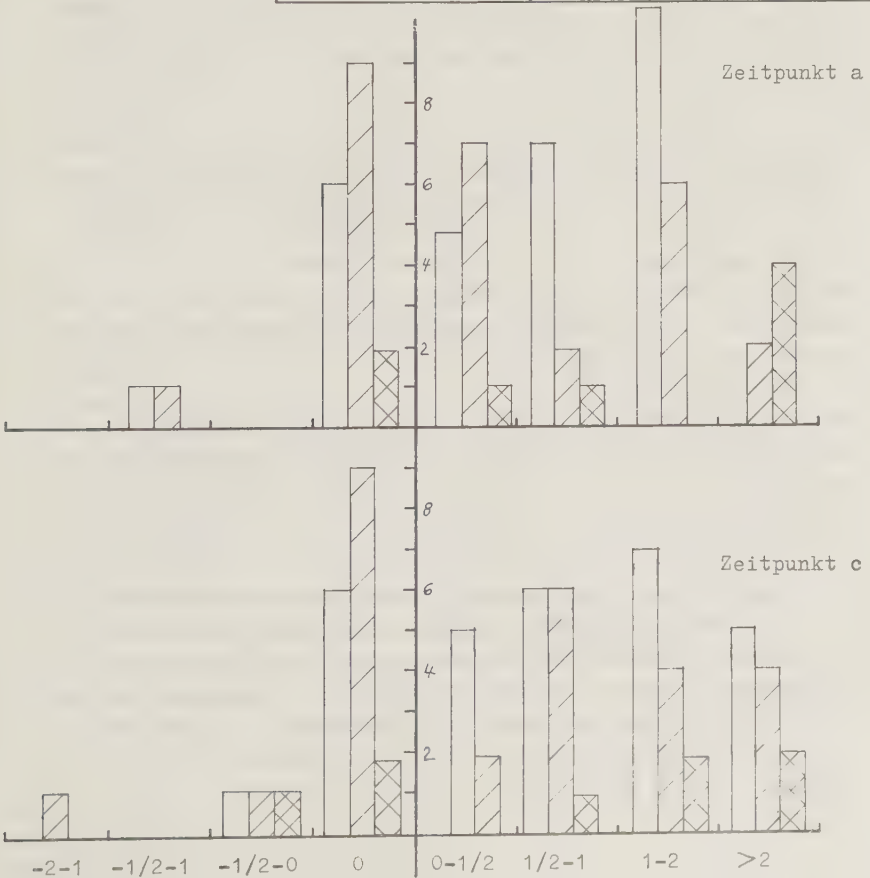
	Steigerungsrate	Zeitpunkt a			Zeitpunkt c		
		Anzahl der Probanden bei den Verhältnissen:					
		1:1	2:1	1:2	1:1	2:1	1:2
Nativ/TCM 1:1	+0 sowie <0	5	8	-	11	7	6
Nativ/TCM 2:1	+0 - 5 %	10	8	5	10	4	1
Nativ/TCM 1:2	+6 - 10 %	9	7	3	3	6	1
	+11 - 15 %	4	1	-	-	7	-
	>15 %	3	3	-	6	3	-



P.S.: Über die Bedeutung von Zeitpunkt a und c
siehe Seite 11

Qualitativ

			Zeitpunkt a			Zeitpunkt c			
			Anzahl der Probanden bei den Verhältnissen						
			Steigerungsrate						
Nativ/TCM	1:1		1:1	2:1	1:2	1:1	2:1	1:2	
Nativ/TCM	2:1		> 2	-	2	4	5	4	2
Nativ/TCM	1:2		1 - 2	11	6	0	7	4	2
			1/2 - 1	7	2	1	6	6	1
			0 - 1/2	5	7	1	5	2	-
			0	6	9	2	6	9	2
			-1/2 - 0	-	-	-	1	1	1
			- 1 - 1/2	1	1	-	-	-	-
			- 2 - 1	-	-	-	-	1	-



Beurteilung:

Bei dem Nativ-TCM Verdünnungsverhältnis 1 : 2 wurden Steigerungen der quantitativen Motilität, die über 10 % hinausgehen, nicht ermittelt. Dies gilt sowohl für initiale als auch spätere Zeitwerte.

Die initiale Steigerungsquote war bei den Verdünnungsverhältnissen 1 : 1 und 2 : 1 nicht wesentlich voneinander verschieden, wenngleich die Steigerungsquote bei 1 : 1 deutlicher ausgeprägt war.

Dieses Verhältnis verschob sich jedoch eindeutig zugunsten von 2 : 1 bei den Spätmessungen. Hier waren die Steigerungsquoten der Verdünnung 2 : 1 deutlich denen von 1 : 1 überlegen.

In 2 von insgesamt 37 Fällen wurde gegenüber Nativsperma eine quantitative Verschlechterung gesehen, desgleichen in ebenfalls 2 Fällen eine qualitative Verschlechterung, allerdings erst nach einem Zeitintervall von ca. 4 Stunden.

In der Beurteilung der Spermienprogressivität wurde ein modifiziertes Verhalten gefunden. Hier wurde die größte initiale Motilitätssteigerung beim Verdünnungsverhältnis 1 : 2 ermittelt, die häufigsten Steigerungen im mittleren Steigerungsbereich wurden bei 1 : 1 gesehen.

Bei den Spätbeobachtungen war im Gegensatz zur quantitativen Bestimmung die qualitative Motilitätssteigerung bei 1 : 2 beachtlich, jedoch nicht mehr so deutlich wie bei der Initialbeobachtung.

Das Verhalten der qualitativen Motilitätssteigerung bei den Verdünnungen 1 : 1 und 2 : 1 glich annähernd dem der quantitativen Motilitätssteigerung, lediglich wurden bei der Verdünnungsreihe 2 : 1 größere Häufungen im Bereich mittelgradiger qualitativer Motilitätssteigerung beobachtet.

Insgesamt läßt sich sagen, daß in nahezu sämtlichen Fällen durch Zugabe von TCM eine sowohl quantitative als auch qualitative Motilitätssteigerung erreicht werden konnte.

Die Spermatozoen zeigten eine gesteigerte Beweglichkeit, die Schlagfrequenz war erhöht, die Progressivität gebessert, nicht motile Spermien konnten zur Beweglichkeit gebracht werden.

Die besten Ergebnisse quantitativer Motilitätssteigerung lagen bei 20 %. Bei starker Zugabe von TCM, also in der Verdünnungsreihe 1 : 2 , hatten wir den Eindruck, daß Schlagfrequenz und Amplitudenhöhe, mehr als sonst beobachtet, zunahmen, also hyperkinetische Bewegungsabläufe entstanden. Weiterhin fiel auf, daß bei Vorgabe dieser hohen TCM - Konzentration die Wiederbelebung nichtmotiler Spermien zu den Zeitpunkten b und c gegenüber den anderen beiden Verdünnungsreihen zurückstand.

In der praktischen Nutzenanwendung würde das bedeuten, daß bei Vorgabe einer starken TCM -Konzentration (1 : 2) gleich zu Beginn eine Spermien Selektion durchgeführt werden könnte. Spermatozoen können in diesem Fall zu einer beträchtlichen initialen Motilitätssteigerung, geringer auch zu einer Steigerung der Progressivität gebracht werden.

Das Verhalten der Spermatozoen bei den Verdünnungsverhältnissen 1 : 1 und 2 : 1 unter Berücksichtigung der quantitativen und qualitativen Motilität war ausgeglichener, wobei sich 2 : 1 durch eine bessere Konstanz im weiteren Zeitverlauf auszeichnete. Damit stellt sich die Verdünnungsreihe 2 : 1 als optimal heraus.

2. Beeinflussung der Spermienmotilität in der Verdünnungsreihe 1 : 1 durch die Temperatur (37°C)

Gewöhnlich werden in der experimentellen und praktischen Humanspermatologie Untersuchungen bei Raumtemperatur (23° bis 25°C) durchgeführt. Diese Bedingung ist zwar im praktischen Betrieb einer Untersuchungsstelle einfach und ohne größeren apparativen Aufwand durchzuführen, es entspricht jedoch nicht den eigentlichen biologischen Bedingungen, d.h. der Körpertemperatur. Die Korrelation zu den anderen spermatologischen und klinisch-andrologischen Kriterien erforderte auch in der vorliegenden Arbeit die generelle Durchführung der Versuche bei Raumtemperatur, um vergleichbare Werte zu erhalten.

Um jedoch die biologischen Bedingungen genauer eingrenzen zu können, wurde eine gesonderte Untersuchungsreihe bei Raum- und Körpertemperatur vorgenommen. Hierfür wurde die Verdünnungsreihe 1 : 1 gewählt.

Es wurde in dieser Untersuchungsreihe somit die jeweilige Steigerung

Nativ / TCM bei Raumtemperatur

verglichen mit den entsprechenden Werten

Nativ / TCM bei Brutschranktemperatur

wobei in der Tabelle die zeitliche Differenzierung beibehalten wurde (Zeitpunkte a, b und c).

In der Graphik wurden aus Gründen der Übersicht summarisch die Steigerungen bei Raumtemperatur gegen die Steigerungen bei Brutschranktemperatur aufgeführt.

Nachfolgend Tabelle und Graphik.

Quantitativ

Anzahl der Probanden
jeweils zu den Zeitpunkten a,b,c

Raumtemperatur

Brutschranktemperatur

Steigerungsrate	a	b	c	a	b	c
$\pm 0 ; < 0$	-	1	1	1	1	2
+ 0 - 5 %	-	-	-	1	1	1
+ 6 -10 %	1	1	-	1	1	-
+11 -15 %	2	1	1	-	-	-
> 15 %	-	-	1	-	-	-

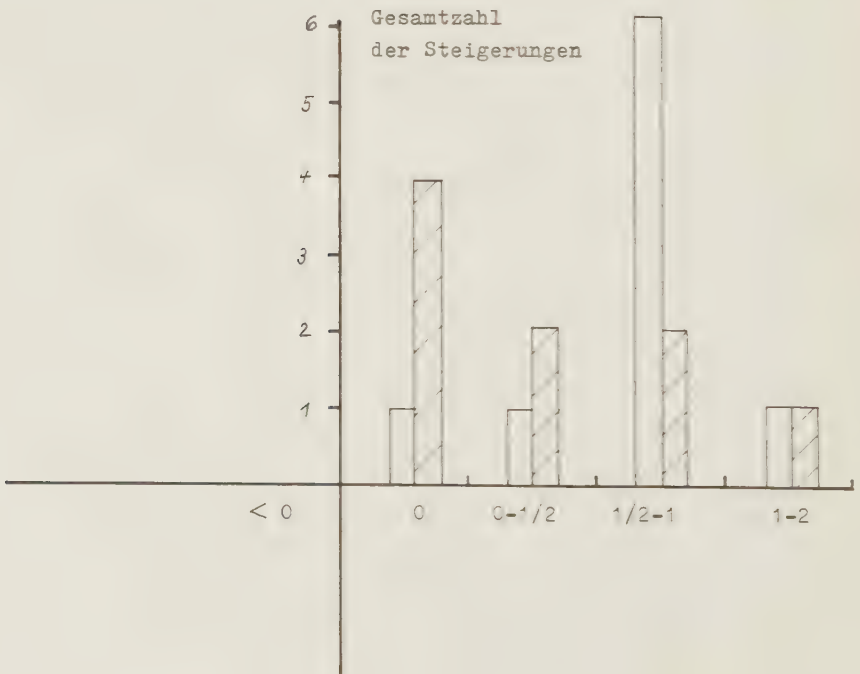


Qualitativ

Raumtemperatur

Brutschranktemperatur

Steigerungsrate	a	b	c	a	b	c
> 2	-	-	-	-	-	-
$1 - 2$	-	-	1	-	-	1
$1/2 - 1$	2	3	1	1	1	-
$0 - 1/2$	1	-	-	-	1	1
0	-	-	1	2	1	1
$- 1/2 - 0$						
$- 1 - 1/2$						
$- 2 - 1$						



Beurteilung

Das Verhalten der Nativproben bei Raum- und Körpertemperatur war verschieden. In einem Fall war eine beträchtliche Motilitätssteigerung bei Körpertemperatur gesehen worden, die jedoch im weiteren Verlauf um so stärker abfiel.

In einem weiteren Fall war die Motilitätssteigerung bei Raumtemperatur initial und im weiteren Verlauf überlegen gegenüber dem Verhalten bei Körpertemperatur.

Ein dritter Fall wies kein differenziertes Verhalten bezüglich des Parameters Temperatur auf.

In der Verdünnungsreihe mit TCM Stammlösung (1 : 1) wurde quantitativ ein insgesamt besserer Verlauf sowohl initial als auch bei späterer Beobachtung unter den Bedingungen der Raumtemperatur gesehen. Die Motilitätssteigerung war ausgeprägter als bei Körpertemperatur, desgleichen die Progressivität.

Die Fallzahl (insgesamt 3) in dieser gesonderten Untersuchungsreihe war gering, das vorgegebene Material in sich zu inhomogen hinsichtlich der Bedingungen Raum- und Körpertemperatur, sodaß keine relevanten Schlußfolgerungen gezogen werden konnten. Für obige Untersuchungsreihe jedoch kann die Aussage getroffen werden, daß die Inkubation bei 37° C keine Vorteile erbringt, weder bezüglich Motilität noch Progressivität.

3. Vergleich der Verdünnungsreihen Nativ TCM 2/1 mit Verdünnungsreihen von Bakerscher und Joelscher Lösung im gleichen Mischungsverhältnis.

Als Wiederbelebungslösungen werden in der praktischen Spermatologie vornehmlich die Bakersche und Joelsche Lösung angewendet. Durch Zugabe solcher Elektrolytlösungen in Verbindung mit Glukose soll geprüft werden, ob durch den Dilutionseffekt die Qualität und Dauer der Motilität gesteigert werden kann, sowie ob nichtmotile Spermatozoen zur Motilität gelangen.

In der vorliegenden Untersuchungsreihe wurden obige Elektrolytlösungen jeweils mit TCM Stammlösung verglichen, wobei als Verdünnungsverhältnis 2/1 gewählt wurde. Dieses Verhältnis hatte sich in den vorausgegangenen Untersuchungen als optimal herausgestellt. Es wurde folgendes Verhalten der Lösungen registriert:

Quantitativ

Nativ/TCM 2:1

Nativ/Baker 2:1

Nativ/Joel 2:1

Steigerungsrate	Zeitpunkt a			Zeitpunkt c		
0 sowie < 0	3	3	4	1	5	5
0 - 5 %	3	2	3	1	0	0
+ 6 - 10 %	2	1	4	2	2	3
+11 - 15 %	3	0	0	5	0	1
> 15 %	1	1	1	3	0	3



Qualitativ

Nativ/TCM 2:1 
 Nativ/Baker 2:1 
 Nativ/Joel 2:1 

Steigerungsrate	Zeitpunkt a			Zeitpunkt c		
> 2	-	-	-	2	-	-
$1 - 2$	5	-	-	3	-	1
$1/2 - 1$	-	2	2	2	-	2
$0 - 1/2$	4	1	3	-	-	-
0	3	1	4	5	5	6
$- 1/2 - 0$	-	2	2	-	1	-
$- 1/2 - 1$	-	1	1	-	-	2
$- 1 - 2$	-	-	-	-	1	1



Beurteilung:

In unseren Versuchen erwies sich in der quantitativen Motilität die Joelsche gegenüber der Bakerschen als überlegen, sowohl initial als auch im späteren Verlauf. Verglichen mit der TCM Stammlösung waren beide Elektrolytverdünner jedoch eindeutig unterlegen, wobei sich dieses Verhalten besonders bei der Spätmessung herauskristallisierte.

Noch deutlicher wurde diese Tendenz bei der Beurteilung der Spermienprogression, wiederum betont in der Spätbeobachtung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die biologische TCM Verdünnung den gebräuchlichen Elektrolytverdünnern eindeutig überlegen ist.

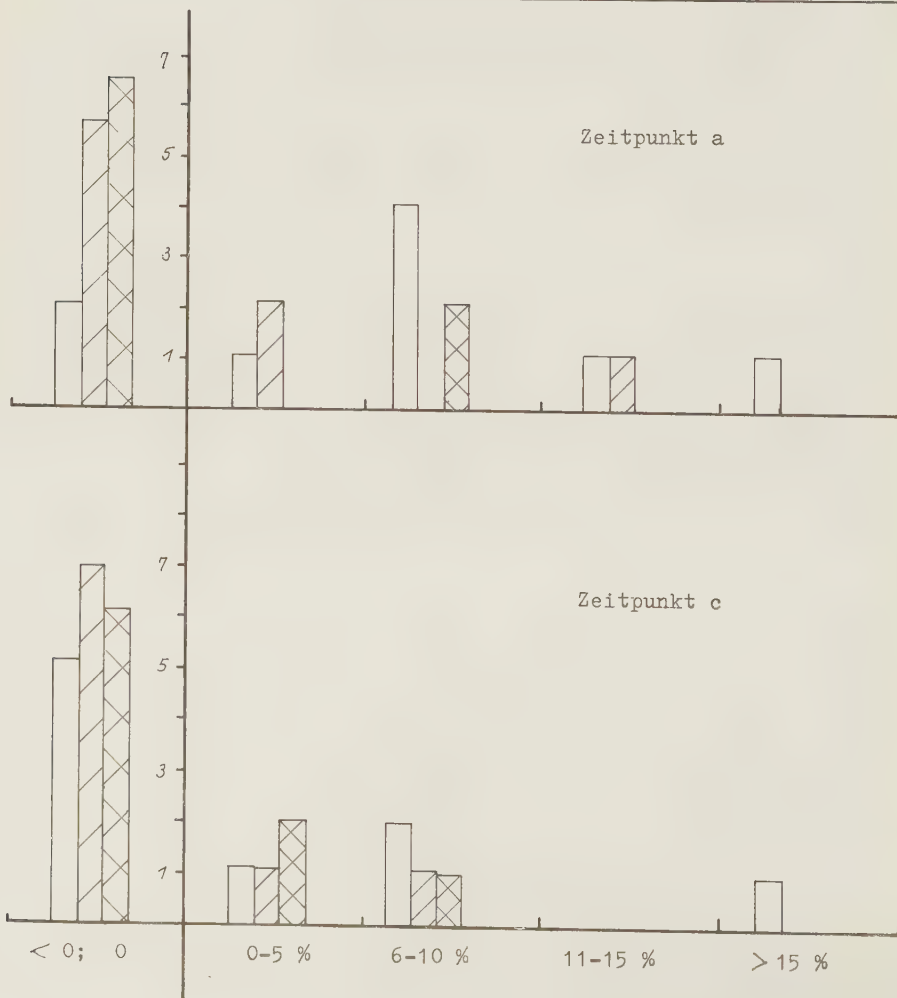
4. Der Einfluß des Glycerins nach Zugabe zur TCM Stammlösung

Zu den TCM-Verdünnungsreihen in den Verhältnissen 1/1 und 2/1 wurde Glycerin zu 14 Vol % zugegeben, was der Glycerinkonzentration des Inseminationsmediums von BEHRMANN und SAWADA entspricht. Die Glycerinendkonzentration entspricht 7 %. Dabei ergab sich folgendes Verhalten:

Quantitativ

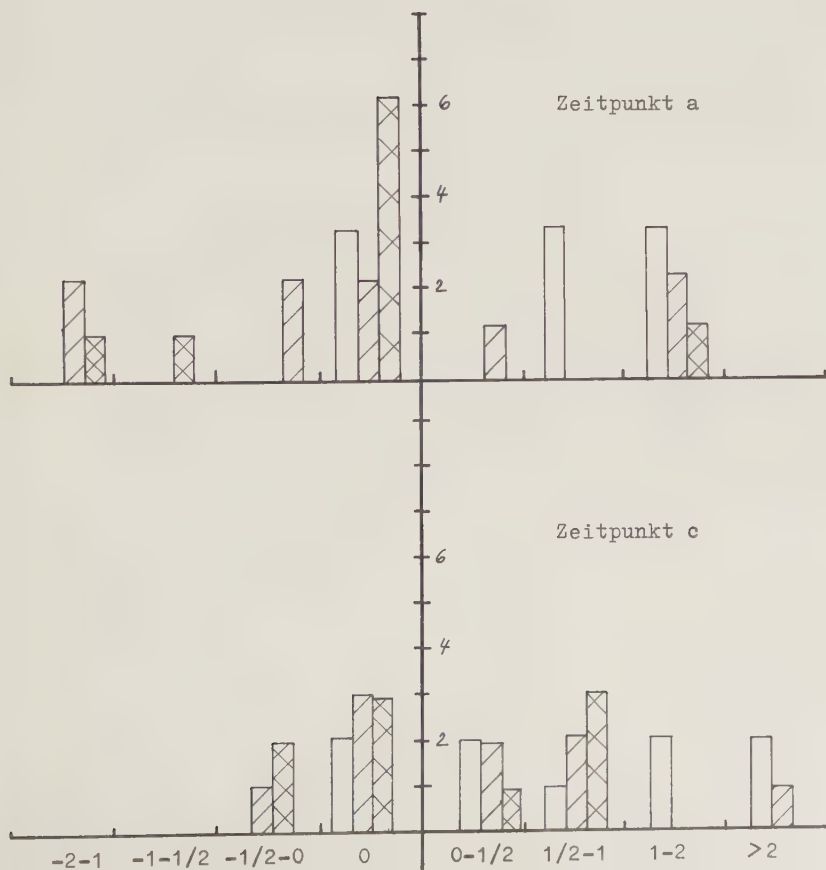
Nativ/TCM 1:1 
 Nativ/TCM 1:1 mit Glyc 
 Nativ/TCM 2:1 mit Glyc 

Steigerungsrate	Zeitpunkt a			Zeitpunkt c		
0 sowie <0	2	6	7	5	7	6
0 - 5 %	1	2	-	1	1	2
+ 6 - 10 %	4	-	2	2	1	1
+11 - 15 %	1	1	-	-	-	-
> 15 %	1	-	-	1	-	-



Qualitativ

Nativ/TCM 1:1			Steigerungsrate	Zeitpunkt a			Zeitpunkt c		
Nativ/TCM 1:1 mit Gly			> 2	-	-	-	2	1	-
Nativ/TCM 2:1 mit Gly			1 - 2	3	2	1	2	-	-
			1/2 - 1	3	-	-	1	2	3
			0 - 1/2	-	1	-	2	2	1
			0	3	2	6	2	3	3
			-1/2 - 0	-	2	-	-	1	2
			-1 - 1/2	-	-	1	-	-	-
			-2 - 1	-	2	1	-	-	-



Beurteilung:

Glycerinzugabe zur TCM-Verdünnung hat gegenüber der reinen TCM-Verdünnung einen motilitätshemmenden Effekt. Hinsichtlich der quantitativen Motilität wird bei Vergleich mit der TCM-Verdünnungsreihe 1/1 deutlich, daß die Steigerungsrate sowohl in der Höhe als auch in der Häufigkeit der Steigerungen bei Glycerinzugabe geringer wird, besonders in der initialen Messung, weniger deutlich in der Spätmessung.

Bei der Beurteilung der qualitativen Motilität war dieser Effekt nicht so klar ausgeprägt. Hier konnte bei einzelnen Chargen durchaus eine auch bei Glycerinzugabe deutliche Progressionssteigerung beobachtet werden, besonders in der zweiten Messung.

Bei anderen Chargen führte der Glycerinzusatz jedoch zu einer Verschlechterung der Progressivität, was in keinem Fall bei reiner TCM Zugabe beobachtet wurde. (Abgesehen von den auf S.18 bereits erwähnten 2 Fällen).

Offensichtlich sprechen die Spermatozoen unterschiedlich auf die Glyzerinzugabe an, was auch von dieser Seite die bisher noch bestehende Problematik der Glycerinzugabe zum artifiziellen Inseminationsmedium aufwirft. Bisher ist die für den jeweiligen Fall optimale Glycerinkonzentration noch nicht eindeutig festgelegt.

Wir hatten den Eindruck, daß die Glycerinzugabe die Schlagfrequenz herabsetzt, was wohl im Zusammenhang mit der durch Glycerin erhöhten Viskosität gesehen werden muß.

5. Beobachtung der Langzeitwirkung von TCM bis 72 Stunden nach Wiederverflüssigung

Beurteilung :

In der Langzeitbeobachtung wurde bei 3 von 7 Proben ein außerordentliches Ergebnis erreicht, insofern als selbst nach 72 Stunden noch Motilität nachweisbar war. In einer Probe war darüberhinaus sogar ganz vereinzelt zu diesem Zeitpunkt noch Progressivität vorhanden. Insgesamt war das Verhalten unterschiedlich.

6. Differenzierung der TCM-Wirkung nach spermatologischen Diagnosen

Die meisten TCM Bestimmungen sind in dem Verdünnungsverhältnis 1/1 durchgeführt worden. Aus diesem Grunde wurde zum Vergleich folgender klinischer Krankheitsbilder dieses Verhältnis herangezogen.

a) Qualitative Asthenozoospermie

Beurteilung:

Die Steigerungsrate der quantitativen Motilität entspricht ziemlich genau der insgesamt festgestellten. Ähnlich verhält sich die Progressivität, wobei jedoch im Kontingent der qualitativen Asthenozoospermie die langanhaltende Verbesserung der Spermienprogression gegenüber dem Gesamtkontingent besser abschneidet.

Somit drückt sich bei der qualitativen Asthenozoospermie die Verbesserung der Spermatozoenprogression am nachhaltigsten aus.

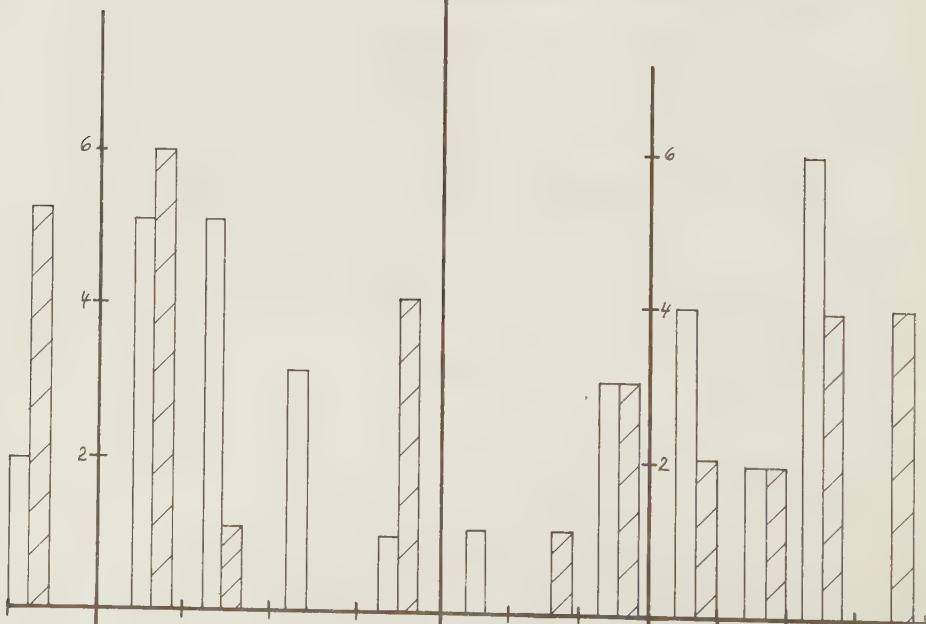
Nachfolgend Tabellen und Graphik.

Qualitative Asthenozoospermie
(16 Patienten)

Quantitativ

Qualitativ

Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c	Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c
0 < 0	2	5	> 2	-	4
0 - 5 %	5	6	1 - 2	6	4
6 - 10 %	5	1	1/2 - 1	2	2
11 - 15 %	3	-	0 - 1/2	4	2
> 15 %	1	4	0	3	3
			-1/2 - 0	-	1
			-1 - 1/2	1	-
			-2 - 1	-	-



b) Qualitative und quantitative Asthenozoospermie

Beurteilung:

Die Fallzahl ist insgesamt gering, sodaß sich Aussagen nur begrenzt treffen lassen. Auffallend war, daß ,verglichen mit dem Gesamtkontingent, die vorliegende Gruppe bei der quantitativen Motilität zwar größere Steigerungsraten im Einzelfall, in der Häufigkeit jedoch keine wesentliche Abweichung aufwies.

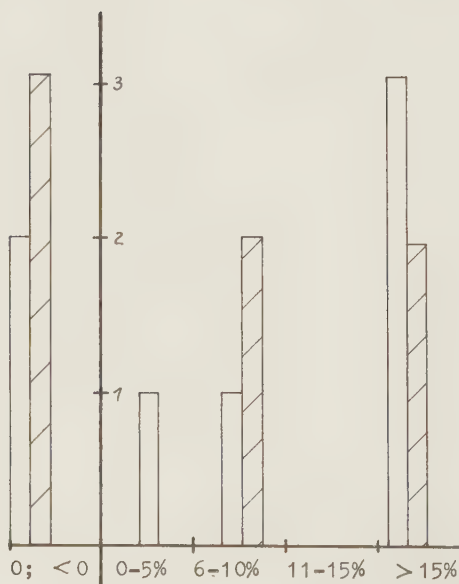
Die Steigerung der Progressivität markiert sich deutlicher durch die Verbesserung bei Spätbeobachtung.

Nachfolgend Tabellen und Graphik.

Qualitative und quantitative Asthenozoospermie

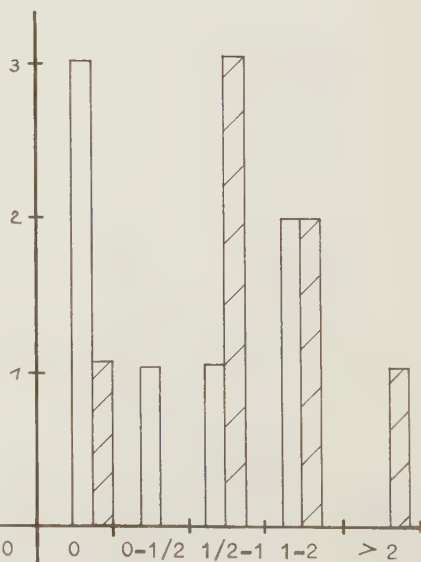
Quantitativ

Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c
0 ; < 0	2	3
0 - 5 %	1	-
6 - 10 %	1	2
11 - 15 %	-	-
> 15 %	3	2



Qualitativ

Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c
> 2	-	1
1 - 2	2	2
1/2 - 1	1	3
0 - 1/2	1	-
0	3	1
-1/2 - 0	-	-
-1 - 1/2	-	-
-2 - 1	-	-



c) Astheno-Teratozoospermie

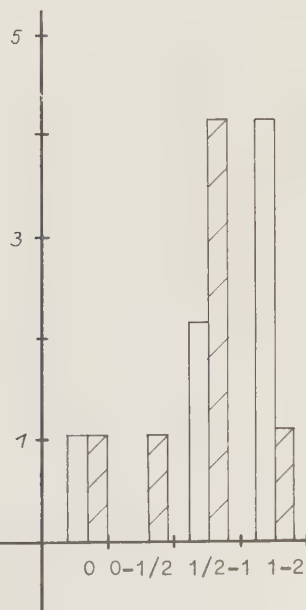
Die Fallzahl ist zu gering ,als daß eine Beurteilung abgegeben werden kann.

Nachfolgend Tabellen und Graphik:

Quantitativ

Qualitativ

Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c	Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c
0 ; < 0	-	3	> 2	-	-
0 - 5 %	5	2	1 - 2	4	1
6 - 10 %	2	1	1/2 - 1	2	4
11 - 15 %	-	-	0 - 1/2	-	1
> 15 %	-	1	0	1	1
			-1/2 - 0	-	-
			-1 - 1/2	-	-
			-2 - 1	-	-

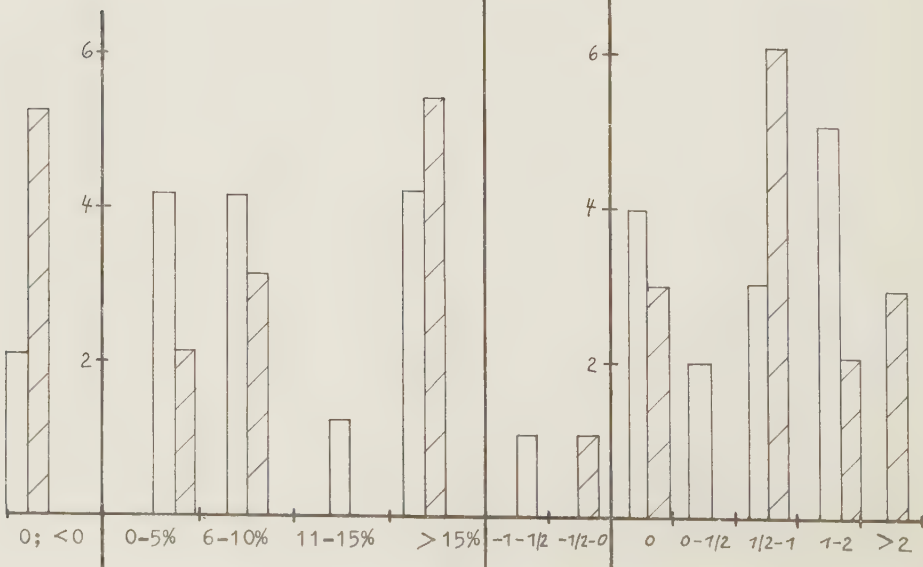


d) Viskositäts- und Agglomerationsphänomene

Quantitativ

Qualitativ

Steigerungs- rate	Zeitpunkt a	Zeitpunkt c	Steigerungs- rate	Zeitpunkt a	Zeitpkt. c
0; <0	2	5	> 2	-	3
0 - 5 %	4	2	1 - 2	5	2
6 - 10 %	4	3	1/2 - 1	3	6
11 - 15 %	1	-	0 - 1/2	2	-
> 15 %	4	5	0	4	3
			-1/2 - 0	-	1
			- 1 - 1/2	1	-
			- 2 - 1	-	-



Beurteilung:

Bei der quantitativen Motilität fanden wir ausgeprägte Steigerungen vor, vor allem bezüglich der Höhe der Steigerungsrate. Die Beeinflussung der Progressivität entsprach ungefähr derjenigen des Gesamtkontingents, besonders bei der Auswertung der Spätmessung.

e) Entzündliche Prozesse

Beurteilung :

Hier resultiert in erster Linie eine Steigerung der quantitativen Motilität in der Häufigkeit, weniger in der Steigerungshöhe.

Im Hinblick auf die Progression ist kein eindeutiger Unterschied festzustellen.

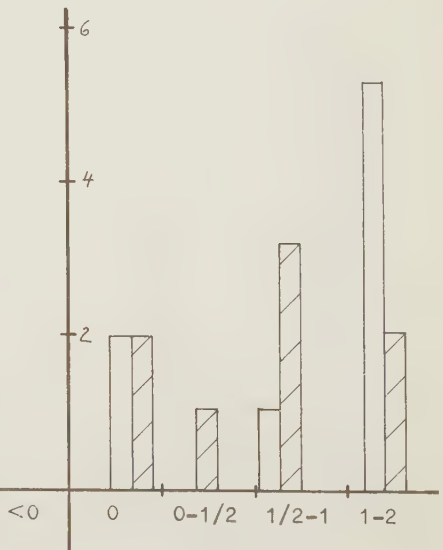
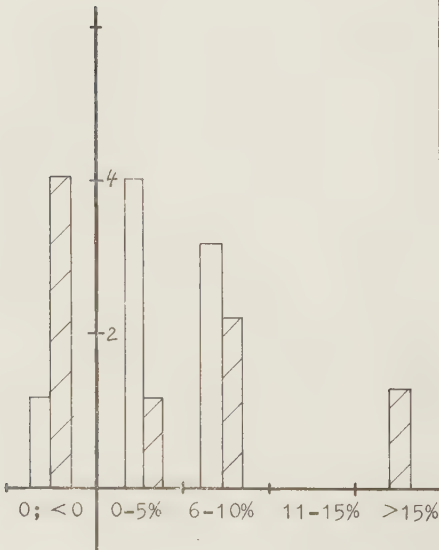
Nachfolgend Tabellen und Graphik.

e) Entzündliche Prozesse

Quantitativ

Qualitativ

Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c	Steigerungs- rate	Zeitpkt. a	Zeitpkt. c
0	1	4	> 2	-	-
0 - 5 %	4	1	1 - 2	5	2
6 - 10 %	3	2	1/2 - 1	1	3
11 - 15 %	-	-	0 - 1/2	-	1
> 15 %	-	1	0	2	2
			-1/2 - 0	-	-
			- 1 - 1/2	-	-
			- 2 - 1	-	-



V. DISKUSSION

In der Humanmedizin findet das von BEHRMAN und SAWADA entwickelte Inseminationsmedium, das eine Verbesserung des ursprünglich von BUNGE und SHERMAN 1953 angegebenen Mediums zur Tiefkühlkonservierung darstellt, breite Anwendung. Es besteht zu 66% aus 5%iger Glukoselösung und und 2,9%iger Citratlösung, beide im Verhältnis 2:3 gemischt; weiterhin aus Eigelb (20 Vol.%) sowie Glycerin (14 Vol.%). Der pH-Wert wird mit NaHCO_3 bzw. NaOH auf 7,2 bis 7,4 titriert.

1958 hatten BAIER, LEIDL und GREIFF die zuerst von BONADONNA festgestellte positive Beeinflussung der Spermatozoenbeweglichkeit durch Zugabe von Glykokoll neu untersucht. Glykokoll ist von BEHRMANN und SAWADA in das Inseminationsmedium in einer Konzentration von 2g% genommen worden.

Die Untersuchungen von BAIER, LEIDL und GREIFF konnten aufzeigen, daß dem Glykokoll eine besondere Bedeutung in der Verbesserung der Spermienmotilität zukommt. Andererseits stellt sich jedoch die Frage, ob eine derartige Wirkung lediglich dem Glykokoll und nicht auch anderen Aminosäuren bzw. einem Aminosäurengemisch zukommen kann.

Im menschlichen Seminalplasma liegt ein komplexes Gemisch von Aminosäuren vor, die teils amphoter, teils sauer, teils basisch sind. In Annäherung an diese Zusammensetzung verhalten sich auch die Sekrete des weiblichen Genitaltraktes. In diesem Zusammenhang sei nochmals an den Vergleich "Ionen und Aminosäuren" im Nativsperma einerseits und im Difco-Medium andererseits erinnert (S. 6, 7 u. 8).

Im Inseminationsmedium wird der Ionengehalt durch Na-Citrat, NaHCO_3 bzw. NaOH und durch die im Eigelb vorhandenen Ionen beigesteuert. In der experimentellen Spermatologie sind ausgedehnte Untersuchungen über Elektrolytlösungen und den quantitativen Gehalt derartiger Elektrolytlösungen hinsichtlich der Beeinflussung der Spermatozoenbeweglichkeit durchgeführt worden.

Dabei hatte aufgezeigt werden können, daß hinsichtlich der Anionen eine abgestufte Wirkung aufgestellt werden kann (Siehe S. 2), ebenso daß K^+ und Mg^{++} Ionen in bestimmter Konzentration vorhanden sein müssen.

In biologischen Suspensionslösungen der Spermatozoen (Seminalplasma, Cervixsekret und anderen Sekreten des weiblichen Genitaltraktes) liegt jeweils ein Elektrolytgemisch vor.

Davon ausgehend stellt sich die Frage, ob ein artifizielles Medium nicht auch eine derartige Ionenzusammensetzung aufweisen muß.

Die energiereichen phosphorylierten Purinkörper wie ATP sind ein integrierender Bestandteil des glykolytischen Spermienmetabolismus. Sie sind sicherlich im Eigelb vorhanden. Dennoch muß zur Diskussion gestellt werden, ob eine zusätzliche Zugabe zu einem artifiziellem Medium nicht von Bedeutung ist.

So gesehen bot sich eine Untersuchung über das Difco-Medium TCM 199 an, das in der Gewebekulturtechnik, besonders bei Viruskulturen, Anwendung findet.

Es handelt sich dabei um ein nutritives basales Medium, das nach den Empfehlungen von MORGAN, MORTON, und PARKER zusammengestellt ist (über die Zusammensetzung des Mediums siehe auch S. 6).

Da das Medium frei von Proteinen ist, sollte es nur bei Zugabe von Eidotter Verwendung finden, wobei jedoch die Konzentration an Eigelb niedriger als sonst gewählt werden darf. Wir unterstellen dabei einen positiven Einfluß der Proteine auf das gesamte Motilitätsverhalten von Spermatozoen.

Auf Grund dieser Überlegungen ist in der vorliegenden Arbeit eine in-vitro Untersuchung über die Wirkung einer TCM-Glukosecitrat-Eigelb-Lösung auf die Spermatozoen zur Durchführung gekommen. Aufgabe der Arbeit war, zunächst die optimale TCM Verdünnungskonzentration zu ermitteln.

Insgesamt konnte festgestellt werden, daß TCM-Beigabe zum Glukosecitrat-Eidotter Medium eine starke sowohl quantitative als auch qualitative Motilitätssteigerung bewirkt. Bei ihren Untersuchungen zur Spermienresistenz gegenüber isotonischer Dilution hatten HOFMANN und WEIRAUCH nachweisen können, daß das in der Humanmedizin übliche Inseminationsmedium von SHERMAN und SAWADA keinen stabilisierenden Effekt auf die Spermatozoenmembran aufweist. Die Spermatozoen waren in ihrer Beweglichkeit bei Zugabe des Mediums nicht gestört, isotone NaCl-Dilution in exzessiver Dosierung wies jedoch den gleichen deletären Effekt auf wie bei der gleichen nicht vorbehandelten Probe.

Im Rahmen dieser Untersuchungsreihe war erstmals eine TCM Zugabe zum Inseminationsmedium zur Anwendung gekommen. WEIRAUCH hatte feststellen können, daß mit Hilfe einer derartigen TCM Lösung der deletäre Dilutionseffekt auf der Stufe der Progressionsimmobilisierung (Verlust der progressiven Spermienbeweglichkeit) vollständig reversibel war und daß darüber hinaus sogar eine Motilitätssteigerung gegenüber dem Ausgangsbefund eingetreten war. Bei diesen Untersuchungsreihen war TCM im Verhältnis 1/1 mit Glukosecitrat und Eigelb zur Anwendung gekommen. Ausgehend von diesen Beobachtungen war im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungsreihen das Mischungsverhältnis variiert worden.

Sperma wurde mit der TCM- Glukosecitrat-Eigelb Lösung in den Mischungsverhältnissen 2:1, 1:1, und 1:2 zusammengebracht und die Spermatozoenbeweglichkeit beobachtet.

Dabei zeigte sich, daß die TCM Zugabe zu einer Steigerung der quantitativen Motilität sowie zu einer Verbesserung der qualitativen Motilität führte.

Die Spermatozoen wiesen eine höhere Schlagfrequenz auf, die Bewegungsgeschwindigkeit wurde gesteigert, der Bewegungsablauf näherte sich der linearen Progression. Bereits gut progressiv bewegliche Spermatozoen wurden in ihrem Bewegungsablauf ebenfalls gesteigert, sodaß hier eher hyperkinetische Bewegungen resultierten.

Eine hohe TCM Konzentration(1:2) erzielte diesen Effekt am ausgeprägtesten,der Prozentsatz an quantitativer Motilität jedoch wurde im weiteren Zeitverlauf eher rückläufig. Eine insgesamt optimale Motilitätssteigerung,die beide Motilitätskriterien,nämlich Quantität und Qualität betrifft, und über einen längeren Zeitraum anhält,war bei 1:1,besonders aber bei 2:1 festgestellt worden.

Dieser Effekt wurde noch verdeutlicht bei den Langzeitbeobachtungen,in denen es gelang, auch noch nach 72 Stunden Motilität mit vereinzelter langsamer Progression nachzuweisen.

Bezogen auf die spermatologischen Diagnosen des vorliegenden Materials ließ sich feststellen, daß vor allem bei leichten und mittelgradigen Einschränkungen der Spermatozoenbeweglichkeit dieser Effekt eintrat.

Bei stärkerer Einschränkung der Motilität wurde weniger eine Verbesserung der quantitativen Motilität,sondern eher eine Steigerung der Spermatozoenprogression beobachtet.

Verglichen mit den üblichen in der Humanmedizin verwendeten Wiederbelebensflüssigkeiten(Baker- und Joel-Lösung) war die Verdünnung mit TCM eindeutig überlegen, auch bei der Langzeitbeobachtung.

VI. Zusammenfassung

1. TCM-Zugabe zum artifiziellen Inseminationsmedium führt zu einer Steigerung der qualitativen und quantitativen Spermatozoenmotilität.
2. Die Analyse der gesteigerten Motilitätsabläufe läßt erkennen, daß die Schlagfrequenz erhöht ist, nicht jedoch die Amplitudenhöhe. Diese Erkenntnis ermittelten wir auf Grund subjektiver Schätzung. Die Steigerung der Spermatozoenmotilität wurde durch eine exakte Auszählung bestimmt, die Beurteilung der Progression durch eine vergleichende Schätzung.
3. Die Motilitätssteigerung hält auch im weiteren Zeitverlauf an, was insbesondere durch die Untersuchungsergebnisse nach 72 Stunden bewiesen werden konnte.
4. Als optimale TCM-Konzentration wurde die Verdünnung 2:1 ermittelt.
5. Es wurden Motilitätssteigerungen bis zu 20% gesehen, bei der Zunahme der Progression waren 2 Stufen keine Seltenheit. Über die Definition der Progressionsstufen siehe S.13.
6. Verglichen mit der Bakerschen und Joelschen Lösung ist der TCM Verdünner in der positiven Beeinflussung der Spermatozoenmotilität eindeutig überlegen.
7. Die besten Motilitätssteigerungen bezüglich der klinisch andrologischen Korrelation wurden bei der isolierten qualitativen Asthenozoospermie gesehen.
8. Glyzerinzugabe in der üblichen Endkonzentration von 7 Vol% führt zu einer Dämpfung der Motilitätsabläufe.

VII. Literaturverzeichnis

1. Baier, W.,
W. Leidl,
W. Greiff. In - vitro Untersuchungen über die
Wirkung von Glykokoll als Verdünner-
zusatz für Bullensperma.
Berliner u. Münchner Tierärztliche
Wochenschrift 10, 229-230 (1956).
2. Bedford, I.M. The Saga of mammalian Sperm from
Ejaculation to Syngamy.
Mammalian Reproduction, ed. by
H. Gibbian and E.J. Plotz.
Berlin - Heidelberg - New York:
Springer (1970)
3. Behrmann, S.J.,
Y. Sawada Inseminations with Human Semen
Frozen and Stored in a Liquid-Nitrogen
Refrigerator.
Fertil. Steril. 17, 457 - 466 (1966)
4. Bishop, D.W. Sperm Motility.
Physiol. Rev. 42, 1-59 (1962)
5. Bishop, D.W.
Walton Mammalian Spermatozoa.
Marshall's Physiology of Reproduction,
Vol. 1, Pt. 2.
London, Longmans. (1960)
6. Difco-Manual Difco Laboratories
Detroit, USA (1966)
7. Eibl, K. Lehrbuch der Rinderbesamung.
Paul Parey, Berlin u. Hamburg, (1959)
8. Heinke, E.,
Doepfmer Fertilitätsstörungen beim Manne.
Jadaschus Handbuch der Haut- u.
Geschlechtskrankheiten
Erg. Werk Bd. VI /3.
Berlin- Göttingen-Heidelberg
Springer (1960).
9. Hornstein, O.P. Entwicklung und aktuelle Bedeutung
der Andrologie.
Münchner med. Wochenschr. 39, 1936-1963 (1969)
10. Hornstein, O.P. Spermatologische Diagnostik.
Verh. Dtsch. Ges.
Inn. Med. 76, 311-318 (1970).
11. Joel, Ch. Studien am menschlichen Sperma.
B. Schwabe, Basel (1960).

12. Joel, Ch. Fertility disturbances in men and women.
S. Karger, Basel-München
Paris, New-York (1971)
13. Jones, R. C. Deep- Freezing Ram Spermatozoa:
I. C. A. Martin The Effects of Milk, Yolk-Citrate and
Synthetic Diluents containing Sugar.
J.Reprod. Fertil. 10,413-423,(1965).
14. Mann,T. Sperm Metabolism.
In: Fertilization,ed. by Ch. Metz and
A. Monroy, 1, 99- 119,
Academic Press, New-York, London (1967).
15. Mann,T. The Biochemistry of Semen and of the
Male Reproductive Tract.
Methuen,London (1964).
16. Molnár,J. Allgemeine Spermatologie.
Akademiai Kiadó, Budapest(1963).
17. Nelson,L. Sperm Motility.In:Fertilization,ed.by Ch.
Metz and A. Monroy, Vol. 1, 27.
Academic Press,New-York London(1967).
18. Schirren,C. Fertilitätsstörungen des Mannes.
Diagnostik, Biochemie des Seminalplasmas,
Hormontherapie.
F. Enke, Stuttgart(1961).
19. Schirren,C. Praktische Andrologie.
Hartmann,Berlin(1971).
20. Tonutti,E.O., Die männliche Keimdrüse.
E. Weller, Georg Thieme, Stuttgart(1960).
Schuchardt
E. Heinke.
21. Vasterling,H. Praktische Spermatologie.
Georg Thieme, Stuttgart(1960).

Herrn Prof. Dr.med. O. H o r n s t e i n danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, für alle Ratschläge sowie für die Bemühungen um die Korrektur.

Herrn Oberarzt Dr.med. N. Hofmann danke ich ebenso herzlich für seine Unterstützung und für alle Anregungen.

L E B E N S L A U F

Am 24.2.1945 wurde ich als Sohn des Dipl.-Ing. Helmut Teller und seiner Ehefrau, Ortrud geb. Hille, in Zwickau/Sachs. geboren. Dort besuchte ich ab 1951 die Volksschule.

1958 kam ich an die Oberrealschule in Augsburg und ab 1961 an das Realgymnasium Neu-Ulm, wo ich 1965 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend ging ich zwei Jahre zur Bundeswehr.

Ab Wintersemester 1967 studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich 1970 ab, die ärztliche Prüfung beendete ich, ebenfalls in Erlangen, am 12.7.1973.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990